

بررسی نسبت جمعیت کروموزوم‌های جنسی X و Y در انزال گاوهای نر هلشتاین و نقش

غلظت تستوسترون خون بر نسبت جمعیتی

مونا خلقی^۱، فرید حیدری^{۱*}، جلال رستم زاده^۲، و محمد رزم کبیر^۲

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بخش زیست فناوری دام و آبزیان

^۲ سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، بخش علوم دامی

تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۱

چکیده

توانایی و امکان تعیین جنسیت گوساله در صنعت دامپروری بسیار حائز اهمیت است و یکی از اهداف دیرینه در صنعت گاو شیری و گوشتی به شمار می‌رود. گاو نر در مقایسه با گاو ماده به علت هتروگامتیک بودن سهم بیشتری در نسبت جنسی ایفا می‌کند. تشخیص نسبت جنسی اسپرماتوزوئیدها از طریق نسبت کروموزوم‌های X و Y قابل انجام است. این پژوهش با هدف تاثیر غلظت تستوسترون خون بر تغییر نسبت جنسی کروموزوم‌های X و Y اسپرماتوزوئیدها در گاوهای هلشتاین از طریق تکنیک Real-Time PCR انجام گرفت. در این تحقیق از ۲۶ راس گاو نر هلشتاین موجود در مرکز اصلاح نژاد ایستگاه عباس آباد مشهد، خون‌گیری و اسپرم‌گیری انجام شد. پس از استخراج DNA از اسپرم به روش بهینه یافته استخراج نمکی، Real-Time PCR برای تکثیر قطعات ۹۰، ۸۹ و ۷۹ جفت بازی به ترتیب برای ژن‌های PLP، SRY و PAR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت و نسبت جنسیت محاسبه شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میانگین حداقل مربعات کروموزوم Y و X به ترتیب $1/23 \pm 0/15$ و $0/71 \pm 0/02$ بود که از نظر آماری داری تفاوت معنی‌داری بودند ($P < 0/05$). همچنین همبستگی نسبی ژن SRY با غلظت تستوسترون خون برابر با ۰/۳۸ برآورد شد که این نتایج نشان می‌دهد با افزایش سطح تستوسترون میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافت. همبستگی بین ژن PLP و تستوسترون خون نیز برابر با ۰/۶۷- برآورد شد. لذا با افزایش غلظت تستوسترون میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن PLP به طور معنی‌داری ($P < 0/01$) کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: ژن SRY، ژن PLP، نسبت جنسیتی، غلظت تستوسترون، Real-time PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۰۳، پست الکترونیکی: heidari@nigeb.ac.ir

مقدمه

محققین معتقدند که اسپرماتوزوئیدهای X و Y دارای قدرت تحرک متفاوت هستند و این امر می‌تواند منجر به افزایش شانس یک گروه از اسپرماتوزوئیدها جهت لقاح با تخمک شود. همچنین فاکتورهایی مانند سطح موکوس سرویکس، pH واژن و زمان تلقیح نیز در این امر دخالت خواهد داشت (۸). تفاوت ذاتی فیزیولوژیکی در قدرت زنده ماندن اسپرماتوزوئیدهای یک جنس، ظرفیت پذیری و

کنترل جنسیت فرزند قبل از تولد چه در مورد انسان و چه در برنامه‌های اصلاح نژاد همیشه مورد نظر بوده است. از سال ۱۹۷۰ به بعد عوامل موثر بر نسبت جنسیتی موالید مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعات به نقش نژاد و گزینش ژنتیکی، فصل، زمان تلقیح مصنوعی در طول فحلی، سرعت متفاوت حرکت کروموزوم‌های X و Y در مایع منی اشاره شده است (۱۷ و ۲۴).

هورمون تستوسترون در جنس ماده منجر به افزایش انحراف نسبت جنسیتی موالید به سمت نرها می‌شود. همچنین جامس و همکاران (۱۹۹۶، ۲۰۰۴) پیشنهاد کرده‌اند افزایش سطح تستوسترون خون نرها می‌تواند منجر به انحراف نسبت جنسی به سمت نرزیایی شود که احتمالاً این اثر ناشی از تغییر نسبت جنسی اسپرماتوزوئیدها می‌باشد زیرا نرها هتروگامتیک هستند.

با استفاده از تکنیک‌های مولکولی همچون Real-time PCR، FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) و فلوسیتومتری امکان بررسی دقیق جنسیت سلولها وجود دارد. در این میان تکنیک Real-time PCR بدلیل ارزان تر و دقیق بودن بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. اساس آشکارسازی محصولات در تمام دستگاه‌های Real-time بر اساس سیگنال فلوروسانس می‌باشد که افزایش شدت فلوروسانس با افزایش محصول تکثیرشده در طول PCR نسبت مستقیم دارد (۲۲).

یکی از ژن‌های موجود در کروموزوم Y، Sex-related Y gene (SRY) می‌باشد، این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم Y نزدیک به ساترومر قرار دارد. از جمله عملکردهای تعیین‌شده برای SRY، شروع رونویسی، اسپیلیسینگ mRNA، شرکت در اسپرماتوزنز، تحرک اسپرم‌ها، تعامل بین اسپرم و تخمک و همچنین تولید تستوسترون می‌باشد (۱۶، ۱۸ و ۲۳). با توجه به اینکه ژن SRY می‌تواند بر زنده‌مانی کروموزوم Y موثر باشد می‌توان نقش آن را بر میزان نسبت جمعیتی کروموزومهای X و Y مورد بررسی قرار داد (۵ و ۱۷).

همچنین ژن کاندید جهت شناسایی کروموزوم X در پژوهش اخیر Proteolipid protein (PLP) می‌باشد. این ژن در همه بافت‌های عصبی و غیر عصبی بیان می‌شود و در همه بافتهای غیرعصبی در طی تکثیر طبیعی، مانع آپوپتوز می‌شود. گرچه طبق بررسی‌های انجام شده، در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت افزایش بیان ژن PLP محرک

واکنش آکروزومی متفاوت و همچنین شرایط حاکم در دستگاه تولیدمثلی ماده، جهت نفوذپذیری لایه زونا (با توجه به زمان تخمک‌گذاری نسبت به زمان تلقیح) ممکن است منجر به لقاحی متفاوت برای دو جنس اسپرم گردد. لذا بسته به سطح بلوغ در زمان لقاح احتمال دارد اووسیت نسبت به اسپرماتوزوئیدهای X و Y جذب ترجیحی داشته باشد (۷).

برخی پژوهش‌ها به نقش استرس بر نسبت جنسیتی تاکید کرده‌اند که علت آن را می‌توان ناشی از تاثیر استرس بر میزان هورمون‌های جنسی دانست. استرس موجب کاهش تستوسترون در مردان و افزایش آندروژن‌ها در زنان می‌گردد (۲۴). لذا بررسی تاثیر هورمون‌ها بخصوص هورمونهای جنسی در نسبت جنسیتی بسیار اهمیت دارد. هورمون تستوسترون قویترین آندروژن از گروه هورمون‌های استروئیدی می‌باشد که از کلمه یونانی به معنی مردساز گرفته شده است. این هورمون دارای اثرات آندروژنیک (جنسیتی) و آنابولیک (سازنده، رشد دهنده) می‌باشد (۱، ۱۰، ۱۱ و ۲۰).

در حدود ۹۵٪ تستوسترون موجود در سرم مرد بالغ، توسط بیضه‌ها و مابقی به وسیله غده‌ی فوق کلیوی تولید می‌گردد. در بسیاری بافت‌ها، تستوسترون بوسیله‌ی عمل آنزیم ۵-آلفا-ردوکتاز به آندروژن قویتر دی‌هیدروتستوسترون Dihydrotestosterone (DHT) تبدیل می‌شود. اگرچه هردو هورمون از طریق یک رسپتور عمل می‌کنند، دی‌هیدروتستوسترون حدود ۲/۵ برابر از تستوسترون قوی‌تر است. همچنین تستوسترون می‌تواند در بسیاری از بافت‌ها به استروژن، تبدیل شود و منشأ عمده استروژن در حال گردش در جنس مذکر تبدیل آندروژن-های بیضه‌ای و غده‌ی فوق کلیوی در بافت چربی است (۲، ۱۰، ۱۱ و ۲۰).

با توجه به پژوهش‌های انجام شده توسط سامولی و همکاران (۲۰۰۸) و گرانت و ایروین (۲۰۰۵) افزایش

فرآیند آپتوتوز می‌باشد (۲۱). لذا با توجه به اینکه نقش هورمون تستوسترون بر نسبت جنسیتی در نرها تاکنون بررسی نشده است پژوهش حاضر با دو هدف زیر انجام شد:

۱- تعیین نسبت جمعیت کروموزوم‌های جنسی در انزال گاوهای نر هلشتاین.

۲- بررسی ارتباط بین تغییرات هورمون تستوسترون در خون و نسبت جمعیتی.

مواد و روشها

مواد: تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدها، از شرکت Merck آلمان تهیه گردید. همچنین از کیت تجاری BioDyne Solis (Cat.NO: 08-24-0000S) به منظور تکثیر قطعات مورد نظر توسط تکنیک Real-time PCR استفاده شد.

روشها: نمونه‌گیری: از ۲۶ راس گاو هلشتاین موجود در مرکز اصلاح‌نژاد ایستگاه عباس آباد مشهد، خون‌گیری و اسپرم‌گیری به صورت همزمان و در ساعات اولیه صبح انجام شد. ابتدا اسپرم‌گیری از گاوهای مورد مطالعه توسط مهبل مصنوعی انجام شد. سپس خون‌گیری توسط لوله‌های ونوجکت Gel-clot activator از محل سیاهرگ دمی انجام گرفت. نمونه‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از جدا شدن سرم، نمونه‌ها آماده انتقال به آزمایشگاه جهت سنجش میزان تستوسترون گردید. اندازه‌گیری تستوسترون توسط کیت تجاری انسانی AccuBind ELISA (Cat. NO: 3725-300)

استخراج و تعیین کیفیت DNA: برای استخراج DNA، از پروتکل استخراج نمکی استفاده شد (۱۵). همچنین جهت تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific) و ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید.

طراحی آغازگرها: بدین منظور ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن‌های هدف و مرجع از بانک اطلاعات ژنی، پایگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) به فرمت FASTA دریافت گردید. سپس در ناحیه حفاظت شده با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 plus، با در نظر گرفتن مؤلفه‌های یک آغازگر مناسب، اقدام به طراحی آغازگرها شد. برای بررسی مناسب بودن خصوصیات ترمودینامیکی و ساختار ثانویه آغازگرهای طراحی شده از نرم‌افزارهای Oligo Analyser v3.1 و Oligo Calculator استفاده گردید و در نهایت اختصاصی بودن آغازگر ژن‌های هدف و مرجع بوسیله نرم‌افزار Primer BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد آزمون قرار گرفت. اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده اختصاصی برای ژن SRY، PLP و ژن مرجع PAR (Proteinase – Activated Receptor) به شرح جدول ۱ می‌باشد. پس از سنتز پرایمرها، چرخه‌های دمایی تکثیر قطعات ژنی مورد نظر با استفاده از روش end point PCR تعیین گردید و نتیجه آن بوسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در فرآیند Real-time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	شماره بانک ژنی	دمای اتصال آغازگر (C°)	طول محصول (bp)
PLP	F:5'-GAGGGAGGGTGGATCATAGA-3' R:5'-CCTCTGGGACCTTCAACAAT-3'	AJ009913-1	۶۰	۹۰
SRY	F:5'-CTCAGACATCAGCAAGCAGC-3' R:5'-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3'	EU581861-1	۶۰	۸۹
PAR	F:5'-GCCATCACATCTGAGACCAC-3' R:5'-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3'	AC234910-2	۶۰	۷۹

جدول ۲- چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش Real-time PCR

مرحله	دما (°C)	زمان
مرحله اول	۹۵	۳۰ ثانیه
مرحله دوم	۹۵	۱۰ ثانیه
	۶۰	۱۰ ثانیه
	۷۲	۱۰ ثانیه
مرحله سوم	۵۵-۵۹	۱۰ ثانیه

$$\Delta C_T = C_{T(Target)} - C_{T(Reference)}$$

$$\Delta C_T = C_{T(PLP)} - C_{T(PAR)}$$

$$\Delta C_T = C_{T(SRY)} - C_{T(PAR)}$$

پس از تعیین میزان ΔC_T برای تمامی نمونه‌ها، میزان $2^{-\Delta C_T}$ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (Statistical Analysis Software) نسخه ۹/۱ انجام شد. قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا با استفاده از رویه تک متغییری (Univariate Analysis) آزمون نرمال بودن داده‌ها انجام و سپس آنالیز آماری با استفاده از آزمون t-test انجام شد. همچنین در نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از رویه Corr در نرم‌افزار SAS ضرایب همبستگی پیرسون بین میزان ژن PLP و SRY با تست‌سترون خون محاسبه شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی غلظت تستوسترون خون در جدول زیر ذکر شده است (جدول ۳).

نمودار تکثیر ژن PLP، SRY و PAR تکثیر مناسب پرایمرهای هر سه ژن را تأیید نمود (شکل ۱).

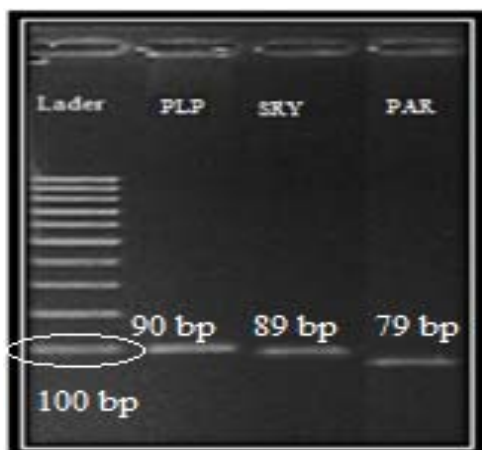
همچنین آنالیز منحنی ذوب که یکی از مراحل اصلی در بررسی داده‌های حاصل از Real-time PCR می‌باشد در

واکنش Real-time PCR طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نمونه‌های DNA حاصل از اسپرماتوزوئید با ۳ تکرار (Replicate Triplicate) آزمایشی و ۱ تکرار کنترل (بدون الگو (NTC))، برای ژنهای PLP و SRY و ژن مرجع PAR با استفاده از دستگاه ABI (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems (Step one)) انجام شد. پس از آماده‌کردن پلیت، تنظیمات مربوط به دستگاه انجام و تحت دستورالعمل جدول ۲ چرخه‌های دمایی واکنش طی سه مرحله زمانی صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای آنالیز داده‌های حاصل از Real-time PCR، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Step-One ABI نسخه ۲/۱، یک گزارش از کلیه اطلاعات موجود به صورت فایل Word استخراج شده و سپس به نرم‌افزار Excel انتقال داده شد.

۲-۲-۶- محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY: پس از بررسی و تحلیل مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (C_T) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه وارد نرم‌افزار Excel گردید. به منظور محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY در اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری شده از گاوهای مورد مطالعه، میانگین C_T برای تکرارهای تکنیکی محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطه ذیل میزان ΔC_T تعیین گردید:

شکل ۲ (نمودارهای الف، ب و ج) نشان داده شده است. نمودار قله ذوب ژن SRY، PLP و PAR نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر می‌باشد.

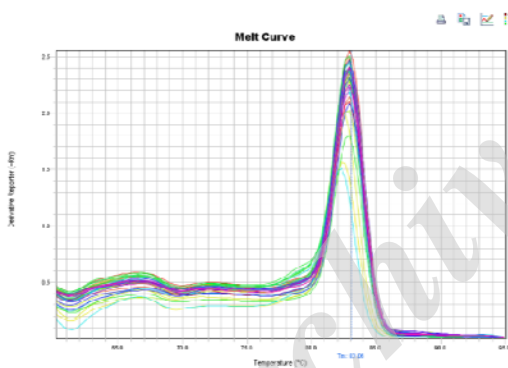


شکل ۱- نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۲ درصد

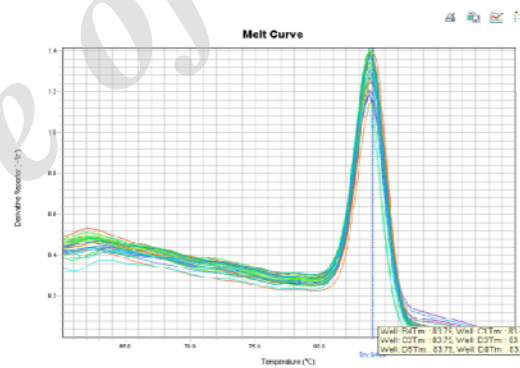
جدول ۳- غلظت تستوسترون خون در گاوهای هلشتاین

شماره دام	تستوسترون خون	ng/ml
۱	۱۱/۴	
۲	۷/۵	
۳	۱۲	
۴	۶	
۵	۶/۵	
۶	۷/۲	
۷	۱۲/۵	
۸	۶/۵	
:	:	
۲۶	۱۱/۶	
میانگین	۹/۴۵ ± ۲/۳۹	

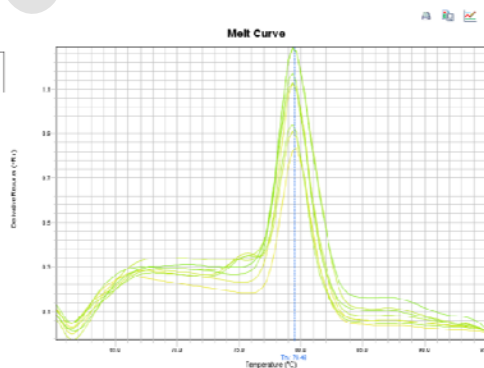
نمودار ب



نمودار الف



نمودار ج



شکل ۲- منحنی ذوب ژن های PAR (منحنی الف)، SRY (نمودار ب) و PLP (نمودار ج)

نتایج نشان می‌دهد با افزایش سطح تستوسترون میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافت. همچنین همبستگی بین ژن PLP و تستوسترون خون ۰/۶۷- برآورد شد لذا با افزایش غلظت تستوسترون میزان نسبی اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن PLP به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) کاهش یافت.

نتایج آنالیزهای آماری اطلاعات حاصل از Real-time PCR در تحقیق حاضر نشان داد که میانگین حداقل مربعات کروموزوم Y و X به ترتیب برابر با $1/23 \pm 0/15$ و $0/71 \pm 0/02$ بود و میان جمعیت اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY و PLP از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۴). همچنین همبستگی نسبی ژن SRY با غلظت تستوسترون خون $0/38$ برآورد شد. این

جدول ۴- مقایسه میانگین جمعیت اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY و PLP

اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY	اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن PLP
$1/23^a \pm 0/15$	$0/71^b \pm 0/02$

(a و b نشان دهنده اختلاف آماری می‌باشد)

نسبت جنسیتی می‌شود زیرا ماخسیدا و همکاران (۲۰۰۵) و (۲۰۰۶) نشان دادند پس از ۶ هفته هورمون تراپی با تستوسترون به همراه پروژسترون ره‌اشدن اسپرماتوزوئیدها (Spermiation)، تعداد اسپرماتوزوئیدها سرکوب شده و نهایتاً اولیگواسپرمی افزایش می‌یابد. سامولی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند افزایش 1 pg/ml سطح تستوسترون و 1 mmol/L گلوکز در موش‌های ماده منجر به افزایش ۱۹٪ انحراف نسبت جنسیتی به سمت نرها می‌شود. گرانت و ابروین (۲۰۰۵) نشان دادند غلظت بالای تستوسترون فولیکولی منجر به افزایش تشکیل زیگوت‌های نر شده است که ممکن است بر اثر تحرک متفاوت Y و یا زنده ماندن اسپرم حاوی Y شود. همچنین در برخی پژوهشها بر نقش هورمون‌های استرس همانند کورتیکوسترون و پیش‌سازهای استروژن که منجر به انحراف نسبت جنسیتی به سمت ماده‌زایی می‌شود تاکید شده زیرا جنین نر در مقایسه با جنین ماده در برابر هورمون‌های استرس به سقط حساس‌تر می‌باشد (۲۴).

اسکوف و همکاران (۲۰۰۴) نیز در پژوهشی بر روی اسپرماتوگنیا (به عنوان یک بافت غیرعصبی) در موش نشان دادند سطح بیان ژن PLP میزان آپوپتوز را تعدیل می‌کند. زیرا در موش‌هایی که تظاهر بیش از حد PLP وجود

همانطور که بیان شد، عوامل گوناگونی جهت برهم زدن اصل فیشر (نسبت جنسی ۵۰ به ۵۰) شناخته شده‌است. در واقع این نسبت تنها مربوط به فرایند میوز می‌باشد ولی مسیری که اسپرماتوسیت‌های ثانویه پس از فرآیند اسپرماتوزون (میوز اسپرماتوسیت‌های اولیه در بافت اپیتلیوم سمینفر) جهت لقاح با اووسیت طی می‌نماید سبب تغییر در نسبت جنسی کروموزوم‌های X و Y اسپرماتوزوئیدها می‌گردد. همچنین پس از این فرآیند نقش کلیدی اووسیت در جذب متفاوت اسپرماتوزوئیدها را نیز نمی‌توان نادیده گرفت (۲ و ۷). یکی از مهمترین فاکتورهای زنده‌مانی ژرم سل‌ها در مردان، هورمون‌ها و عمدتاً تستوسترون می‌باشند. زیرا تستوسترون از طریق تنظیم مسیر خاص ژن‌های آپوپتوز در زنده‌مانی ژرم سل‌ها نقش دارد. بنابراین نتایج این تحقیق با نتایج سامولی و همکاران (۲۰۰۸) و گرانتو همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد. همچنین ژائو و همکاران (۲۰۰۱) و ژانگ و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد کردند مصرف تستوسترون منجر به القای آپوپتوز اسپرماتوسیت و اسپرماتید با افزایش FAS/FASL می‌گردد و با افزایش بیان BAX/BCL2 هر دو مسیر درونی و بیرونی آپوپتوز فعال می‌شود. تستوسترون احتمالاً یا از طریق آنتی‌ژن‌ها و یا از طریق گیرنده مرگ موجب تغییر

ماده دخیل هستند ولیکن افزایش هورمون تستوسترون منجر به افزایش اسپرماتوزوئیدهای حاوی کروموزوم Y شده است. مطالعات مولکولی اندکی مکانیسم تستوسترون بر آپوتوز ژرم سل‌ها را مورد بررسی قرار داده است. لذا پیشنهاد می‌گردد نقش این هورمون در فرآیند اسپرماتوزن و مسیر سیگنالینگ آپوتوز در پژوهش‌های آتی بررسی گردد.

سپاسگزاری: با نهایت احترام و سپاس از جناب آقای مهندس جعفری و کلیه پرسنل مرکز اصلاح نژاد عباس‌آباد مشهد که در تهیه نمونه‌های این پژوهش ما را یاری نمودند.

داشت میزان آپوتوز نیز افزایش یافت و برعکس. آنها همچنین بیان کردند افزایش بالای بیان PLP منجر به اسیدی شدن چشمگیر مایع خارج سلولی می‌شود که این امر به خودی خود منجر به افزایش آپوتوز می‌شود.

همچنین ذکر این نکته حائز اهمیت است که تفاوت معنی‌دار در نسبت جمعیتی اسپرماتوزوئیدهای مورد بررسی لزوماً منجر به موفقیت بیشتر اسپرماتوزوئیدهای حامل ژن SRY برای تشکیل زیگوت نیست. زیرا در تشکیل زیگوت عوامل بسیاری، از جمله زنده‌مانی، سرعت حرکت اسپرماتوزوئیدها و همچنین شرایط فیزیولوژیکی جنس

منابع

- ۱- جواهری زاده، هژیر. ۱۳۷۸. فیزیولوژی غدد درون‌ریز. انتشارات شادگان. صفحه ۳۲۵.
- ۲- ضمیری، محمد جواد. ۱۳۸۵. فیزیولوژی تولید مثل. انتشارات حق شناس. صفحه ۶۴.
- 3- Cheryl S and Roberts R. (2004) Maternal Diet and Other Factors Affecting Offspring Sex Ratio. *Biology of reproduction*. 1063–1070
- 4- Chunjin L, Yongfeng S, Kangle Y, Chengjiao L, Xiaoling Z, Chen L and Zhou X. (2011) Detection of the SRY Transcript and Protein in Bovine Ejaculated Spermatozoa. *Asian-Australian journal of animal science*. 24(10): 1358 - 1364
- 5- Denny P, Swift S, Connor F and Ashworth A. (1992) An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *The Embo Journal*. 11(10): 3705 - 3712
- 6- DiNapoli L and Capel B. (2008) SRY and the Standoff in Sex Determination. *Molecular Endocrinology*. 22(1): 1–9
- 7- Dominko T and First N. (1997) Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*. 47: 456–467
- 8- Grant V. (1994) Maternal dominance and the conception of sons. *British Journal of Medical Psychology*. 67: 343–351
- 9- Grant VJ and Irwin RJ. (2005) Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos. *Experimental Zoology*. 303: 1120–1125
- 10- Guyton, A. C and J. E, Hall. 11th Edition. *Medical physiology*. Elsevier. pp: 318
- 11- Hafez, B. (7th Edition). *Reproduction in Farm Animals*. Black well. pp: 258
- 12- James WH. (2004) Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. *Human Reproduction*. 19(6): 1250-1256
- 13- Jimenez A, Gutierrez-Adan A, Fuentes dl, Pintado B. (2001) Relationship between time to synchrony of embryo transfer and sex ratio on mice. *Theriogenology*. 55: 1, 500
- 14- Makhsida N, Grace Yan J, Fisch H and Shabsigh R. (2005) Hypogonadism and metabolic syndrome: implication for testosterone therapy. *The Journal of Urology*. 174: 827–834
- 15- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 12-15
- 16- Modi D, Shah C, Sachdeva G, Gadkar S, Bhartiya D and Puri C. (2005) Ontogeny and cellular localization of SRY transcripts in the human testes and its detection in spermatozoa. *Reproduction*. 130: 603–613
- 17- Parati K, Bongioni G, Aleandri R and Galli A. (2006) Sex ratio determination in bovine semen:

- A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*. 66: 2202–2209
- 18- Paul DW, Wallis MC, Graves JAM. (2007) Mammalian sex Origin and evolution of the Y chromosome and SRY. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 18: 389–400
- 19- Samuli H and J Jokela. (2008) Temperature-related birth sex ratio bias in historical Sami: warm years bring more sons. *Biology Letters*. 4: 60-62
- 20- Scanlon VC and Sanders T. (2007) Essentials of Anatomy and physiology. F. A. Davis. pp: 156
- 21- Skoff RP, Bessert DA, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave KA, Carlock L, Ghandour MS and Armant DR. (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. *Cell Death and Differentiation*. 11: 1247–1257
- 22- Tevfik Dorak M. (2006) Real-time PCR. Newcastle-upon-UK. *Taylor & Francis Group*. 1-25
- 23- Vatten LJ, Skjaerven R. (2004) Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation. *Early human development*. 76: 47–54
- 24- William HJ. (2004) Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. *Human Reproduction*. 19(6): 1250-1256
- 25- Zhang ZH, Zhou XC, Wei P, Hu ZY and Liu YX. (2003) Expression of Bcl-2 and Bax in rhesus monkey testis during germ cell apoptosis induced by testosterone undecanoate. *Archives of Andrology*. 49: 439–447

Investigation of the ratio of X and Y chromosomes population in Holstein bulls' ejaculation and the role of blood testosterone concentration on population ratio

Kholghi M.^{1,2}, Heydari F.¹, Rostamzadeh J.² and Razmkabir M.²

¹ National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

² Animal Science Dept., University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

The ability and possibility of calf sex determination is very important in animal husbandry industry and is one of old aims in dairy and beef cattle industry. Due to being heterogamete, bull has a greater contribution in sexual ratio than cattle. Specification of sexual ratio in spermatozooids is done with X and Y chromosomes ratio. This study was conducted in order to determine the effect of blood testosterone concentration on change in X and Y sexual chromosomes' ratio of spermatozooids in Holstein bulls using Real-Time PCR technique. In this study, blood and sperm samples were collected from 26 Holstein bulls at breeding center in Abbas Abad station. After DNA extraction from sperms by Salting out method, in order to proliferation of 90, 89 and 79 base pair pieces for PLP, SRY and PAR genes respectively, Real-Time PCR was done using specific primer and sexual ratio was calculated. The results of statistical analysis showed that the least square mean of X and Y chromosomes was 1.23 ± 0.15 and 0.71 ± 0.02 respectively and had a significant difference. Also, the correlation of SRY gene with blood testosterone concentration was estimated 0.38 that these results reveal that with an increase in the level of testosterone, the relative amount of spermatozooids carrying SRY gene will increase significantly. Additionally, correlation between PLP gene and blood testosterone was estimated 0.67, so with an increase in testosterone concentration, the relative amount of spermatozooids carrying PLP gene decrease significantly.

Key words: SRY gene, PLP gene, sex ratio, testosterone concentration, Real time-PCR